

ヒドラにおける生体構造の再生と機能の発現

著者	板山 朋聡
号	1356
発行年	1991
URL	http://hdl.handle.net/10097/6629

氏 名	いた 板 やま 山 とも 朋 あき 聡
授 与 学 位	博 士 (工 学)
学位授与年月日	平成 3 年 12 月 11 日
学位授与の根拠法規	学位規則第 5 条第 1 項
研究科, 専攻の名称	東北大学大学院工学研究科 (博士課程) 電子工学専攻
学 位 論 文 題 目	ヒドラにおける生体構造の再生と機能の発現
指 導 教 官	東北大学教授 澤田 康次
論 文 審 査 委 員	東北大学教授 澤田 康次 東北大学教授 稲場 文男 東北大学教授 山本 光璋

論 文 内 容 要 旨

第一章 研究の背景と目的

“生命とは何か”という問いかけは、古今より、哲学者、宗教家のみならず、全ての人々の関心を引き付けてきた、素朴な疑問である。近年、分子生物学の進歩の結果、生命の分子論的基盤に基づく、生命現象の理解は、著しく進んだ。しかし、個々の生命現象を理解するだけでは、“生命とは何か”という問いに対する答えとして充分ではない。この分子論的理解と相補的な、“生きている状態”の理解とも言うべき、普遍原理の究明が必要になってくる。

従来より、この“生きている状態”の理解に対して、物理学は重要な貢献を果たしている。その中で、近年の非平衡開放系の物理に基づく理解は重要である。しかし、日常の現象が、ほとんど非平衡現象であることを思うなら、この概念だけでは、“生きている状態”を捉えきれないことは自明である。さらに、異なる観点から、“生命状態”と“非生命状態”を捉える必要がある。

科学的理解のためには、実験的研究が不可欠であり、適切な実験系の確立が望まれる。“生きている状態”を理解する為に最善な系は、“生きていない状態”から“生きている状態”へと遷移する系であると考えられる。もちろん、この系は現在、まだ実現出来ていない。しかし、近似的な実現は可能である。そのような系の一つとして、解離細胞再集合体の再生系が上げられる。解離再集合体の再生過程では、始め、細胞が無秩序に集合した状態からはじまり、最終的に、固体と見なせる構造を構築して行く。この固体性の確立、いわば、“固体としての生命”の獲得過程を研究することで“生きている状態”の理解への一歩とする。

固体性の確立において、生命の持つ“秩序構造”が重要と考えられる。さらに、自立的に生きることが出来るための“機能”が是非必要である。この機能は、再生過程での固体としての構造の構築にともない、獲得されて行くと考えられる。そこで、本研究では、ヒドラを用いた解離細胞再集合体の再生過程において、神経系の構造の秩序化と、それにもなう運動機能の獲得について研究を行った。

第二章 ヒドラについての基本的知識

ヒドラの体制：ヒドラは中空の円筒状—外胚葉と内胚葉からなる二胚葉性の組織で、頭部、体幹部、足部が一次元状に並んでいる。頭部には口丘と触手がある。

収縮運動と電気生理現象：外胚葉の上皮筋細胞の筋繊維は体軸方向に走り、これが収縮すると、ヒドラの体は収縮する。一方、内胚葉性の上皮筋細胞は体軸の円周方向に走り、これが収縮すると、ヒドラは弛緩する。このヒドラの収縮をトリガーするのは神経細胞であるが、興奮は上皮筋細胞間を伝導してゆく。この伝導は Epithelial Conduction (EC) と呼ばれていて、上皮性細胞間の gap 結合が関与していると示唆されている。外胚葉性上皮筋細胞が興奮するとき、Contraction Pulses (CPs) とよばれる、筋電位が観測される。内胚葉性上皮筋細胞が興奮するときには Rythmic Potentials (RPs) という周期的筋電位が観測される。CPs は数 mV から、数10mV の波高を持ち、RPs は 1 mV 以下である。

神経系：神経細胞は間細胞 (Icell) より分化して生じ、形態から、神経節細胞、感覚神経細胞に分類出来る。さらに、所持している神経ペプチド (RF アミド, オキシトシン/バソプレッシン (VAS)・・・) からも幾種かに分類できる。分布は頭部と足部に集中している。

再生現象：ヒドラの再生力の強さは有名であり、特に、頭部再生については、数多くの実験が行われてきている。その頭部再生現象は、非拡散性の頭部活性化因子 (HA) と拡散性の抑制因子 (HI) の自己触媒、相互触媒作用を考えることにより説明できる。これは、Gierer-Meinhardt モデルと呼ばれる反応拡散方程式として定式化されている。

第三章 ヒドラ神経系の再生

この章では解離再集合体での、RF+神経細胞と VAS +神経細胞の再生過程での動向を見た。

(実験方法)

解離再集合体の作製手順：ヒドラを高浸透圧溶液中で、機械的に細胞解離させる。細胞解離液を遠心し、再集合体を得る (以上 4℃)。室温に戻し、再生を開始させる。再生に伴い、順次、溶液を希釈し通常の飼育液にまで戻す。(再生開始約 6 時間：外胚葉性細胞と内胚葉性細胞が各々、外側と内側の細胞層に並ぶ、24 時間後：内部が空洞化、2 - 3 日後：触手が出現、4 日後：口丘形成、7 日後：再生完了)

神経系は、免疫細胞化学の手法 (一次抗体として、抗 RF アミド、抗オキシトシン/バソプレッシンを用いた) により可視化する。

(結果と考察)

大域的構造：RF + N_v は再生初期（三日目以前）は再生体全体にランダムで一様に現れ、その後、頭部、足部の再生とともに、それらの部域へ局在化した。VAS + N_v も同様な傾向を示した。RF + N_v の平均密度の変化は再生一日目に急激な増加を開始し、二日目以降はゆっくりと増加して行った。頭部切断したヒドラで作製した解離再集合体の場合、増加の開始時点は一日遅れ、再生二日目に急な上昇を示した。

微視的構造：神経間の平均結合数は、再生一日目から急に増加を開始し、2日目になるとほぼ定常状態に達した。しかし、結合状態は、初期は完全にランダム結合であったが、再生が進み、局在化する段階になると、部域に応じた特徴的なパターンを示し始めた。

大域的な神経系の構造の再生は頭部活性化因子により、制御されているとして、説明できた。

第四章 ヒドラ再生過程における機能発現

この章では、解離再集合体の再生過程における自発的収縮運動と電気的活動を測定した。

（実験方法）

自発的収縮運動は収縮時の散乱断面積変化に伴う、散乱光強度変化の時間微分（収縮速度と見なした）により評価した。電気的活動は、ガラス微小電極を用いて、再生体の異なる二点で測定した。

（結果と考察）

自発的収縮運動は、再生約20時間後に初めて観測され、再生の進行とともに、頻度や収縮速度が増大した。活動電位は再生約13時間で増加を始め、再生が進行するにつれ、大きなパルスの割合が増加した。解離再集合体での活動電位の二点相関は、約12-13時間で急激に増加し、その後、緩やかに増加して40時間で約80%に達した。同じ電極位置で、相関は0と1の中間的な値を示した（不完全相関）。

収縮速度の増加は、上皮筋細胞間の gap 結合の再生に伴う同時興奮可能なクラスターの拡大と密接に関係していることが示唆された。相関の増大もクラスターの拡大を反映していることが示唆された。

収縮頻度や、活動電位の頻度は、このクラスターにシナプス結合している、トリガ神経細胞の数に比例することが示唆された。不完全相関の原因は興奮伝導経路の揺らぎの結果であることが考えられた。

第五章 パーコレーション モデルと実験結果の比較

この章では、パーコレーション過程として、再生過程の上皮筋細胞のクラスター形成を捉え、このモデルによる収縮運動速度や二点相関の時間発展の説明を試みた。さらに、パーコレーションクラスター上での興奮の伝搬をシミュレーションした。

（シミュレーション方法）

100X100の正方格子を用い、ボンドパーコレーション過程を実行し、クラスターサイズ s の分布 $N(s)$ を求め、 $sN(s)$ をボンドの形成確率 P を変えてプロットした。これは、四章の実験で求めた、収縮速度や活動電位波高のヒストグラムに対応すると考えた。また、二点相関関数も、同時に

計算した。

興奮の伝搬については、100X100の三角格子上で、興奮モデルとして3状態オートマトンモデルを用いた。

(結果と考察)

クラスター形成：収縮運動速度、活動電位波高ヒストグラムと二点相関の各々は、実験結果とモデルの間に類似点が認められた。しかし、両者間の関係において、モデルの結果と実験結果が、再生二日目近くでは、一致しなかった。これは、モデルを考える時の、一様なボンド形成(実験ではgap結合に対応)の仮定に問題があると考えられた。現実には、一様にクラスター形成が行われるのではなく、部域化が再生に伴い進行し、一様性が破られていくものと考えられた。

パーコレーション クラスター上での興奮の伝搬：パーコレーション クラスター上での興奮の伝搬による情報伝達はクラスター内の欠陥により、妨げられることがわかった。これは、欠陥の回りで、反響回路が形成されるためだということがわかった。さらに、不応期を、欠陥のサイズより長くとれば、反響は妨げることがわかった。

第六章 実験結果のまとめと総合考察

この章では、以上の結果をまとめ、さらに結果を総合して、解離細胞再集合体の固体性の獲得について以下のような考察を行った。

再生開始直後は、解離細胞再集合体は外胚葉と内胚葉が入り混じった無秩序な細胞塊で、細胞間の結合もない。約6時間後までには、外胚葉性細胞と内胚葉性細胞が各々、外側と内側の細胞層に並ぶ。上皮筋細胞間の電気的結合(gap結合と考えられる)も形成が進行し、同時興奮可能な上皮筋細胞のクラスターが拡大して行く。約18時間以後になると、二点相関が高くなり、このクラスターが再生体全体に拡大していると考えられる。しかし、クラスターのサイズ分布は、収縮速度分布や活動電位の波高分布から、大小様々な分布をしていると考えられる。これは、最初は一様な確率で形成されると考えられる電気的結合が、再生の進行に連れ、クラスターがブロック化したり、周囲とは電気的に隔絶した島状の領域などが現れたりする為であると考えられる。

このような、一様から、不均一状態への変化は神経系の構築においても見られる。再生開始約二日目までは、RF+Nv, VAS+Nvは一様に再生してくる。二日目以後、頭部、足部の構築とともに、それらの部域への局在化が進行してくる。これは、空間構造における、一様状態から非一様状態への転移として見る事が出来る。これは、頭部活性化因子の反応拡散機構に基づく空間構造の形成の結果であるとみなせる。

再生体が生きている状態と言うことが出来るためには、少なくとも協調性のある行動を可能にしていなければならない。そのためには興奮伝搬の空間相関、つまり情報伝達能力が必要である。これは、再生初期で実現された。つぎに、高度な機能の獲得のためには、空間構造の非一様化、つまり反応拡散機構に基づく空間情報の生成が必要である。これは、再生後期に実現された。

審 査 結 果 の 要 旨

生体は遺伝情報によって、その種独特の構造と機能に関する同一性を保っている。一方、生体は構造の部分的損傷に対する修復能力があるばかりでなく、固体を細胞に解離し無秩序に集めた細胞集団からでも固体を再生出来る場合がある。局部的又は全体的な秩序の回復には細胞内の遺伝情報以外に細胞間長距離相互作用の自己組織が不可欠であり、その機構に関する基礎研究は発生生物学のみならず、生物の可塑性の応用を目指す生体情報工学にとっても重要である。

著者は、多細胞生物としては最も下等な腔腸動物ヒドラを細胞に解離し、その無秩序集合体からの生体構造と神経回路網の再生及び機能の再現過程を観測定量化した。本論文は、これらの成果をまとめたもので全編6章よりなる。

第1章は序論で、本研究の背景と目的について述べている。第2章ではヒドラ固体における細胞の種類とその構造及び電気生理等に関してこれまでに蓄積された知識について概括している。

第3章では、再生中の細胞集合体に新しく分化する神経細胞を間接蛍光抗体法によって可視化し、再生の進行に伴って変化する神経細胞の分布及び神経細胞間の結合を観測した結果について述べている。これは細胞間秩序が完全に破壊された細胞群が多細胞固体を再生する際に、情報伝達機構として必要な神経系の再編過程を初めて明らかにしたもので評価出来る。

第4章では構造の再生に伴って再現する神経活動と自発的収縮運動を測定した結果について述べている。神経活動は2本の微小ガラス電極を用いて再生中の細胞集団の細胞外誘導電位を測定し、進行と共に変化するパルス頻度とその波高分布を求めた。更に2点での観測パルスの相関は再生開始後約12時間頃から増大を始め、約40時間で約80%に達することを見出している。光散乱による自発的筋収縮の速度と頻度の測定からは、上皮筋細胞間のギャップ結合の進行に関する基礎知識を得ている。これらの結果は、固体再生の過程を知る有用な新しい知見であり、評価出来る。

第5章は以上の結果を細胞間のパーコレーションモデルと比較したもので、乱雑さの存在する再生初期においてのみ、モデルが測定結果を説明することを示している。第6章は結論である。

以上要するに、本論文は無秩序細胞集合体から多細胞生体固体の構造と機能を再生する過程を説明する多くの新しい知見を得たもので、生体情報工学の発展に寄与するところが少なくない。

よって、本論文は博士（工学）の学位論文として合格と認める。